



TITLE:

Genetic studies on pleiotropic polyoxin resistant mutants of *Bipolaris maydis*(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Chen, Daidi

CITATION:

Chen, Daidi. Genetic studies on pleiotropic polyoxin resistant mutants of *Bipolaris maydis*. 京都大学, 2018, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21158>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	陳 帶 娣
論文題目	Genetic studies on pleiotropic polyoxin resistant mutants of <i>Bipolaris maydis</i> . (トウモロコシごま葉枯病菌の多面的なポリオキシシン耐性株の遺伝学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>トウモロコシごま葉枯病菌で見出されたポリオキシシン耐性遺伝子<i>pol2</i>ならびに<i>pol5</i>は薬剤耐性だけではなく耐性株の菌叢赤色化やアントラキノン類蓄積などの多相遺伝を引き起こすが知られている。本論文は、これら遺伝子ならびにその多面性発現メカニズムをゲノム配列比較、遺伝子破壊・相補、ならびに化学分析などの実験手法を用いて分子遺伝学的に解析した結果を取りまとめたものであり、以下の6章で構成されている。</p> <p>第1章は、序論であり、本研究の背景ならびに本論文で取り扱う課題について解説した。</p> <p>第2章では、全ゲノム配列比較ならびに形質転換による遺伝子相補実験を用いて<i>pol2</i>ならびに<i>pol5</i>を分子遺伝学的に再同定した。<i>POL2</i>はhydroxymethylbilane synthaseをコードすること、<i>POL5</i>はferrochelataseをコードし、両者ともヘム生合成系に関わる遺伝子であることが判明した。また、これら遺伝子の破壊はほぼ致命的な効果を示すこと、<i>pol2</i>ならびに<i>pol5</i>を有する株では、野生型株に比べて菌体重あたりのヘム含量が約40%減少していることをも明らかにした。</p> <p>第3章では、ヘム生合成系遺伝子の突然変異が多面的な表現型を示すメカニズムを明らかにする目的で、菌叢赤色化に着目して研究を行った。メラニンを欠損し菌叢呈色が観察し易い<i>pol2 alb3</i>二重変異株を変異原処理し新規菌叢呈色突然変異株を作出した。突然変異株全ゲノム配列を野生型株全ゲノム配列と比較し、突然変異株特異的な多型を有する遺伝子を明らかにするとともに、それらについてバイオインフォマティクスによる機能予測を行い、原因突然変異遺伝子<i>byp1</i>の候補を選抜した。さらに、候補遺伝子ならびにその近傍に存在する複数遺伝子について、遺伝子破壊による機能確認を行い、最終的に赤色化に関わる<i>Rep</i>遺伝子クラスターを同定した。本クラスターは、<i>Aspergillus niger</i> のazaphilone色素合成に関わる<i>Aza</i>遺伝子クラスターに類似し、その主要構成遺伝子、すなわち<i>BYP1</i>、<i>REPIII</i> ならびに2種のpolyketide synthase (PKS) 遺伝子 (<i>PKS21</i>、<i>PKS3</i>) は<i>pol2</i>依存的に発現していることが明らかとなった。同クラスター内に存在する転写因子遺伝子<i>REPI</i>は<i>pol2</i>依存的な赤色色素合成に関与しておらず、<i>Rep</i>遺伝子クラスター遺伝子の発現制御には<i>REPI</i>以外の転写因子遺伝子に関わるものと考えられた。</p> <p>第4章では、アントラキノン類について研究を行なった。PKSアミノ酸配列と各PKS代謝産物情報を利用し系統解析を行った結果、<i>PKS19</i>、<i>PKS20</i>がアントラキノン類生合成に関与することが示唆された。そこで、<i>pol2 alb3</i>二重変異株由来の遺伝子</p>			

破壊株を作出し、蓄積する代謝物の変化を分析した。その結果、*pol2 alb3*二重変異株培養物からemodinなどの類縁体 6 種が同定され、*PKS19*破壊によりその全てが消失することが確かめられた。さらに、*PKS19*と遺伝子クラスター (*Emd*遺伝子クラスター) を形成すると予測された近傍遺伝子 12 種について、それぞれ遺伝子破壊株を作出し、それらの代謝物を分析することにより、各遺伝子のアントラキノン類生合成系における役割を明らかにした。また、*Emd*遺伝子クラスターを構成する主要遺伝子の発現様式についても調査を行った。その結果、生合成系最上流で芳香族環形成を担う *PKS19*ならびに *EMDVIII*は、*pol2*依存的に発現していることが明らかになった。また、修飾に関わる還元酵素遺伝子 *EMDV*ならびに脱水酵素遺伝子 *EMDVII*の発現は *pol2*よりもメラニン生合成系変異の影響を強く受けており、メラニン合成系に由来するポリケタイド化合物がこれらの発現制御に関わっている可能性が示唆された。*Emd*遺伝子クラスターに存在する 2 種の転写因子遺伝子は *PKS19*ならびに *EMDVIII*の発現に関与するものの、その働きは限定的でこれら遺伝子の *pol2*依存的な発現制御において中心的な役割を担っていないことが判明した。

第 3 章、第 4 章の研究を通して、本薬剤耐性株の多面的な形質に関わる二次代謝物の生合成系が明らかとなり、それら生合成系主要遺伝子の発現が薬剤耐性遺伝子依存的に調節されていることが突き止められた。しかし、第 2 章で明らかになったように耐性遺伝子の実体はヘム生合成系酵素遺伝子の突然変異型アシルであり、その翻訳産物が遺伝子の転写制御を行うとは考え難い。そこで、第 5 章では *pol2*依存的な発現調節に関わる転写因子遺伝子を探索し、その解析を行った。具体的には、第 3 章での研究手法同様に、*pol2 alb3*二重変異株を変異原処理し、予想形質を持つ突然変異株をスクリーニング、全ゲノム配列比較ならびに遺伝子相補により突然変異遺伝子を同定した。見出された遺伝子 *RPR1*は $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ 型転写因子をコードし、その遺伝子破壊は *pol2*依存的に引き起こるポリオキシシン耐性ならびに二次代謝物遺伝子の発現を消失させた。*RPR1*遺伝子は *pol2*依存的に発現するとともに、自己依存的にも発現制御されることがわかった。さらに、遺伝子データベースの調査から、Pleosporales 目の近縁種広くに *RPR1*ホモログが分布していること、*Alternaria alternata*の酸化ストレス依存的に発現する遺伝子群に本ホモログが含まれていることが判明した。

第 6 章では、以上の結果を統合し、*pol2*ならびに *pol5*突然変異株で確認されたヘム欠乏が酸化ストレスを発生させ、その結果、多面的な表現系発現に至るメカニズムを論ずるとともに、ポリオキシシン耐性メカニズムについての考察を行った。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は 1 頁を 38 字×36 行で作成し、合わせて、3,000 字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 words で作成し
審査結果の要旨は日本語 500～2,000 字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

トウモロコシごま葉枯病菌の*pol2*ならびに*pol5*遺伝子はポリオキシシン耐性遺伝子としてメンデル遺伝学的に同定されていたが、これら耐性株では菌叢呈色変化や野生型では認められない二次代謝物蓄積など多様な形質変化が認められ、突然変異とその多相遺伝の関係については長らく謎に包まれていた。本研究ではこれら遺伝子を分子遺伝学レベルで再同定するとともに表現型形質に関わる代謝系ならびにそれに関与する遺伝子を解明し、多相遺伝のメカニズムを明らかにしたものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. ポリオキシシン耐性遺伝子 *pol2* ならびに *pol5* をゲノム配列比較手法によって分子遺伝学レベルで再同定し、ヘム生合成系酵素 *hydroxymethylbilane synthase* ならびに *ferrochelatase* をコードすることを明らかにした。また、これら突然変異株では、菌体内ヘム欠乏が生じていることを明らかにした。
2. 菌叢赤色化とアントラキノン類蓄積に関わる二次代謝物生合成系遺伝子とそれら遺伝子クラスターを明らかにした。
3. 両遺伝子クラスターの主要遺伝子は、*pol2* 依存的な発現制御を受けていること、本菌の両遺伝子クラスターに存在する転写因子遺伝子はそれらの発現制御には関与していないことを明らかにした。
4. *pol2* 依存的な発現制御を担う遺伝子 *RPR1* を同定した。本遺伝子の *pol2* 依存的な発現が多相遺伝の中心的役割を担い、上記二次代謝物生合成系遺伝子の発現制御だけでなくポリオキシシン耐性まで支配していることを明らかにした。さらにヘム欠乏によって引き起こる酸化ストレスが *PRP1* 遺伝子の発現を誘導している可能性を示した。

以上のように、本論文は、ポリオキシシン耐性遺伝子*pol2*ならびに*pol5*のもつ多相遺伝のメカニズム解明をとおして、真菌類の二次代謝物生合成系やそこに関わる遺伝子の発現制御さらにはストレス応答と関係を明らかにしたものであり、微生物環境制御学、菌学ならびに天然物化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成30年2月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）